

# $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的研究进展及其应用前景

张博润 刁爱坡\* 何秀萍

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

在啤酒酿造中,双乙酰(diacetyl)是影响啤酒风味成熟、熟化期长短的主要因素,当其含量超过阈值( $0.15 \times 10^{-6}$ )时,产生令人难以接受的馊饭味。双乙酰主要是啤酒酵母代谢的产物,由 $\alpha$ -乙酰乳酸( $\alpha$ -acetolactate)经非酶氧化脱羧产生,酵母的双乙酰还原酶将其还原成乙偶姻(acetoin),再由乙偶姻还原酶还原为 2,3-丁二醇。乙偶姻和 2,3-丁二醇几乎不影响啤酒风味。因此,把双乙酰含量降到阈值以下是熟化期的主要目的,也是熟化期时间限制因素。所以,如何减少双乙酰含量、缩短熟化期、提高啤酒质量和产量,一直是国内外啤酒工业急待解决的重要问题。

$\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶( $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, 简称 ALDC, EC, 4.1.1.5)可将 $\alpha$ -乙酰乳酸直接脱羧转化成乙偶姻,而不经形成双乙酰的步骤。若将此酶用于啤酒生产,可大大缩短啤酒熟化期,从而提高设备的利用率和节省能源,具有重大的社会经济利益。鉴于 ALDC 在啤酒发酵及其它酒类发酵工业上的应用前景,吸引了不少学者从不同途径开展了 ALDC 的研究。本文对该领域的研究进展及其应用前景作一简要综述。

## 1 微生物来源的 ALDC 及其物理、化学特性

自从 Juni 等人<sup>[1]</sup>首次报道了从产气气杆菌(*Aerobacter aerogenes*)分离到 ALDC 以来,不少学者对微生物来源的 ALDC 及其物理、化学特性进行了一系列研究<sup>[2-7]</sup>。表 1 列出了一些微生物来源的 ALDC 的物理、化学特性。

## 2 ALDC 的分子生物学研究

2.1 ALDC 的序列分析: Svendsen 等人<sup>[7]</sup>依据短芽孢杆菌 ALDC 的氨基酸序列,分析得出短芽孢杆菌 ALDC 完整的 260 个氨基酸序列。并根据 ALDC 的一级结构推测了二级结构,其中 54% 为 $\alpha$ -螺旋,34% 为 $\beta$ -折叠。Sone 等人<sup>[8]</sup>通过 ALDC 基因克隆、活性测定等证明了产

气肠杆菌的 ALDC 基因位于 1.4kb 的 BamHI-EcoRI 片段上,他们测定了该片断的核苷酸序列,证明该片段含有一个 780 个核苷酸的完整蛋白编码区,从 DNA 序列推导出 ALDC 的 260 个氨基酸序列。Diderichsen 等人<sup>[9]</sup>通过对短芽孢杆菌的 ALDC 编码及其边界区域的核苷酸序列分析,从 DNA 序列分析推算出 ALDC 的氨基酸序列,其序列与 Svendsen 等人<sup>[7]</sup>直接测定的序列相同。Yamano 等人<sup>[10,11]</sup>的研究表明醋化醋杆菌木质亚种的 ALDC 基因位于 1.2kb KpnI-EcoRI 片段上,他们测定了该片段的核苷酸序列,开读框架编码 304 个氨基酸。其 ALDC 氨基酸序列与产气肠杆菌 ALDC 的氨基酸序列相比,有 45.7% 的同源性,同短芽孢杆菌 ALDC 的氨基酸序列有 35.6% 同源性。醋化醋杆菌木质亚种 ALDC 氨基酸的同源序列分布在除 N-末端以外的序列上,其中高度同源区为 Gly<sup>103</sup>-Ile<sup>115</sup>上述三种不同来源的 ALDC 在该区的同源性为 85%,由此可推测 Gly<sup>103</sup>-Ile<sup>115</sup>区对 ALDC 的活性起着十分重要作用。对醋化醋杆菌木质亚种 ALDC 基因的核苷酸序列分析表明,其 N-末端(1-129bp)有几种可能的起始密码子,核糖体结合位点位于密码子 GLG(130bp)的上游,N-末端区(1-129bp)与其它细菌 ALDC 基因相比无同源性。另外,他们发现 ALDC 基因的翻译起始点位于 130bp 处所表达的 ALDC 具有最大活性,这说明 ALDC 基因的起始密码子可能位于 130bp。在密码子 GLG(130bp)的上游没有发现能形成二级结构导致翻译受阻的特殊序列。至今还不了解为什么 ALDC 基因的翻译起始点位于 196bp 处所表达的 ALDC 活性要比起始点位于 130bp 或 208bp 处所表达的 ALDC 活性低。

2.2 ALDC 基因的克隆和表达研究: Sone 等人<sup>[12]</sup>克隆

国家自然科学基金资助项目;

\* 沈阳农业大学代培硕士研究生

1996-03-20收稿

表1 一些微生物来源的ALDC的物理、化学特性

来源	分子量	PI	最适pH	最适反应温度	金属离子	抑制剂
产气气杆菌( <i>A. aerogenes</i> )	31000/62000	4.7	6.2/6.4	40℃	$\text{Sn}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$	金属络合物
地衣芽孢杆菌( <i>B. licheniformis</i> )	31000/62000	4.7	5~6	40℃	$\text{Zn}^{2+}$	金属络合物
短芽孢杆菌( <i>B. brevis</i> )	35000/70000	7.6	6~7	40℃	$\text{Zn}^{2+}$	金属络合物
乙酰短杆菌( <i>B. acetylum</i> )	31000/62000	4.4	6	40℃	$\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	金属络合物
双乙酰乳酸链球菌( <i>S. diacetylactis</i> )	31000/62000	4.7	5~6	40℃	$\text{Zn}^{2+}$	金属络合物
干酪乳杆菌( <i>L. casei</i> )	31000/62000	4.7	5~6	40℃	$\text{Zn}^{2+}$	金属络合物
肺炎克氏杆菌( <i>K. pneumoniae</i> )	31000/62000	4.7	6~7	40℃	$\text{Zn}^{2+}$	金属络合物

了产气肠杆菌的 ALDC 基因,分别在 *E. coli* 和啤酒酵母细胞中表达,结果证明转化子的每毫克蛋白含 2~3 个 ALDC 酶活单位。Diderichsen 等人<sup>[9]</sup>克隆了短芽孢杆菌的 ALDC 基因(*aldB*),分别在大肠杆菌和枯草杆菌中表达,在大肠杆菌中表达的 ALDC 是在细胞内,而在枯草杆菌中表达的 ALDC 大部分在细胞外。Suihko 等人<sup>[13]</sup>将克氏杆菌的 ALDC 基因克隆到能在酵母细胞中自我复制的质粒上,转化酵母菌,获得具有 ALDC 活性的转化株。Blomqvist 等人<sup>[14]</sup>将产气肠杆菌的 ALDC 基因克隆到表达载体上转化酵母菌,亦获得具有 ALDC 活性的转化株。鉴于含有外源 DNA 的质粒载体在酵母细胞中的稳定性问题,他们采用基因置换方法将上述 ALDC 基因置换到酵母的染色体上,从而获得稳定的转化子。Fujii 等人<sup>[15]</sup>将产气肠杆菌的 ALDC 基因克隆到酵母整合质粒(YIp)上,通过转化酵母受体菌 Ip00751,将 ALDC 基因克隆到酵母整合到受体菌的染色体上,进而使转化株的 ALDC 基因在非选择条件下保持稳定。Yamano 等人<sup>[16]</sup>将醋化醋杆菌木质亚种的 ALDC 基因克隆到带 G418 抗性标记的整合质粒上,转化 G418 敏感的受体菌,将 ALDC 基因整合到受体菌的染色体上,从而获得稳定高效表达的转化株。通常研究外源基因克隆和在酵母细胞中表达时,一般采用乙醇脱氢酶 I(ADCI)、磷酸甘油酸激酶(pGK)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GPD)启动子作为表达外源基因的启动子。Yamano 等人比较了上述三种启动子对 ALDC 基因在酵母细胞中表达水平的作用。他们发现,当转化子在 30℃ 条件下振荡培养时,带有 GPD 启动子的 ALDC 基因的表达水平最高;而用转化子进行发酵实验时,含有 PGK 启动子的 ALDC 基因的表达水平最高。由此可推测出转化子在振荡培养和发酵条件下培养所表现出的

ALDC 活性差异是由于糖酵解启动子的不同表达水平决定的,从而证实 PGK 启动子是 ALDC 基因在啤酒酵母中高效表达的最强启动子。

### 2.3 带有外源 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌的构建

随着对 ALDC 研究的深入,加之其在啤酒酿造中的重大应用价值,近年来已开始采用分子生物学技术,将外源 ALDC 基因引入本身不含 ALDC 基因的啤酒酵母,构建 ALDC 酶活高、能快速将双乙酰的前体乙酰乳酸转化成乙偶姻,从而降低双乙酰含量、缩短熟化期的啤酒酵母工程菌。如 Stahl 等人<sup>[17]</sup>构建了含巴氏醋杆菌的 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌,实验室发酵实验结果表明啤酒熟化期缩短 1 周,总双乙酰含量明显降低,啤酒风味不受影响。Worbel 等人<sup>[18]</sup>构建了含纹膜醋杆菌的 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌,发酵对比试验结果证明熟化期缩短 4~10d,双乙酰含量显著减少,啤酒风味不变。Goosens 等人<sup>[19]</sup>把乙酰羟酸异构酶基因(ILV5)整合到啤酒酵母染色体上,构建成啤酒酵母工程菌,对比发酵试验结果表明双乙酰含量减少 50%,对啤酒风味无影响。Yamano 等人<sup>[20]</sup>构建了含纹膜醋杆菌 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌,实验室发酵结果表明工程菌发酵的啤酒中总双乙酰含量仅为亲株的 60%,而工程菌和亲株发酵生产的啤酒风味无本质区别。Onnela 等人<sup>[21]</sup>利用缺失-800bp~1500bp 上游的乙醇脱氢酶(ADH1)启动子,进行了细菌 ALDC 基因在啤酒酵母中的表达研究,构建了不产双乙酰的啤酒酵母工程菌。中试规模试验结果证明,该工程菌产生的 ALDC 足以降低双乙酰的含量,该工程菌既适合于低浓度麦芽汁发酵,也适合于高浓度麦芽汁发酵。本实验室在国家自然科学基金支持下,近年也开始了这方面的研究。我们已从短芽孢

杆菌中分离到 ALDC 基因, 目前正在进行载体改建、受体菌的确定、克隆和表达研究, 拟构建熟化期短的啤酒酵母新品系。

### 3 ALDC 的应用前景

在啤酒生产中, 降低双乙酰的途径很多, 例如原料选用、改进糖化工艺、选择优良酵母菌种、改进发酵工艺等都可减少双乙酰生成量, 但更有效地解决这一问题, 则是使用 ALDC。丹麦 Novo 公司开发了一种新型酶制剂- $\alpha$ -乙酸乳酸脱羧酶 Matunex<sup>[22]</sup>, Matunex 是一种棕色液态酶制剂, 密度为 1.25g / ml, 该产品符合国际认可的食品级酶制剂的技术标准。Matunex 在啤酒正常发酵的所有 pH 值范围内都是稳定的, 在 pH 为 6 时效果最好, 而在 pH 为 4 时, 其活力也可达到最高活力的 20% 左右。在正常的发酵温度下, 这种酶非常稳定, 该酶的最适作用温度为 35~40℃, 在正常发酵温度条件下, 酶活力可达到最高活力的 15%~20%。发酵试验表明, 酶用量为 23AUU / L 麦芽汁, 主发酵温度 13℃, 保持 6d, 然后降到 7℃, 保持 1 / 3d, 发酵后双乙酰含量可降到  $0.05 \times 10^{-6}$  以下。陈炜等人<sup>[23]</sup>从地衣芽孢杆菌中提取 ALDC 粗酶, 用于啤酒主发酵和后发酵试验, 实验结果证明对降低主发酵和后发酵啤酒中的总双乙酰量 (主要为乙酰乳酸和双乙酰) 均有一定效果, 尤其对后发酵啤酒效果尤为明显。朴镇熙等人<sup>[24]</sup>报道了将 ALDC 用于啤酒发酵的实验室和生产规模试验, 发酵试验证明, 加入 ALDC 可使发酵周期由原来的 25d 缩短 10d, 从而提高设备利用率 40%, 发酵啤酒的外观指标、理化指标都达到部颁标准; 锥形罐发酵试验结果表明, 发酵周期由原来的 20d 缩短到 13d, 提高设备利用率 40%, 经济效益显著。

除将 ALDC 酶制剂用于啤酒发酵外, 另一条缩短啤酒熟化期, 降低 $\alpha$ -乙酰乳酸及双乙酰含量的途径是利用基因工程技术将外源的 ALDC 基因引入本身不含 ALDC 基因的啤酒酵母中表达, 构建带有 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌<sup>[17~21]</sup>, 用于啤酒酿造。最近, Tada 等人<sup>[25]</sup>利用构建的带有外源 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌进行了啤酒酿造中试实验, 结果表明大大缩短了熟化期, 而且生产的啤酒质量与亲株生产的啤酒相同。

综上所述, 随着对 ALDC 的深入研究, 可以预见 ALDC 酶制剂及带有 ALDC 基因的啤酒酵母工程菌

必将为啤酒酿造行业带来一次革新, 将产生巨大经济效益。

### 参 考 文 献

- [1] Juni E. *J Biol Chem*, 1952, 195: 75~76.
- [2] Godfredsen S E, Lorck H, Siggaard P *et al.* *Carlsberg Res Commun*, 1983, 48: 239~247.
- [3] Godfredsen S E, Rasmussen A M, Ottesen M *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, 20: 23~28.
- [4] Løken J P, Stormer F C. *Eur J Biochem*, 1970, 14(1): 133~137.
- [5] Ohshiro J, Aisaka K, Uwajima T. *Agric Biol Chem*, 1989, 53(7): 1913~1918.
- [6] Olsen F. *Pat Appl EPO128714*, 1988.
- [7] Svendsen IB, Jensen BR, Ottesen M. *Carlsberg Res Commun*, 1989, 54(4): 151~163.
- [8] Sone H, Fuji T, Kendo K *et al.* *J Biotechnol*, 1987, 5(1): 87~91.
- [9] Diderichsen B, Wedsted U, Hedegaard L *et al.* *J Bacteriol*, 1990, 172(8): 4315~4321.
- [10] Yamano S, Tanaka J, Inoue T. *J Biotechnol*, 1994, 32: 165~171.
- [11] Yamano S, Kendo K, Tanaka J *et al.* *J Biotechnol*, 1994, 32: 173~178.
- [12] Sone H, Fuji T, Kendo K *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54(1): 38~42.
- [13] Suihko M I, Blomqvist K, Penttilä M *et al.* *J Biotechnol*, 1990, 14: 285~300.
- [14] Blomqvist K, Suihko MI, Knowles J *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(10): 2796~2803.
- [15] Fujii T, Kondo K, Shimizu F *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(4): 997~1003.
- [16] Yamano S, Tomizuka K, Tanaka J *et al.* *J Biotechnol*, 1994, 37: 45~48.
- [17] Stahl U, Debourg A, Villanueva KD *et al.* *EBC Microbiology group Bulletin*, 1990, 83~94.
- [18] Wrohel R & Jones BL. *J Inst Brew*, 1992, 98(6): 479~491.
- [19] Goossens E. *J Inst Brew*, 1993, 99(3): 208.
- [20] Yamano S, Tomizuka K, Sone H *et al.* *J Biotechnol*, 1995, 39: 21~26.
- [21] Onnela M L, Suihko M L, Penttilä M *et al.* *J Biotechnol*, 1996, 49: 101~109.
- [22] Jepsen S. *Breer Guardian*, 1993, 122(9): 55~56.
- [23] 陈 炜, 何秉旺, 杨家兴, 等. *微生物学通报*, 1994, 21(2): 82~85.
- [24] 朴镇熙, 许松玉, 赵坚豪, 等. *工业微生物*, 1994, 24(2): 39~41.
- [25] Tada S, Takeuchi T and Sone H *et al.* *Proceeding of the European Brewing Convention Congress*, Brussels, 1995, 369~376.